#### (19) **日本国特許庁(JP)**

# (12) 公 開 特 許 公 報(A)

(11)特許出願公開番号

特開2005-6646 (P2005-6646A)

(43) 公開日 平成17年1月13日(2005.1.13)

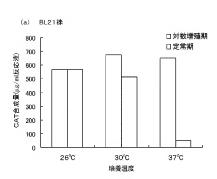
(51) Int.C1. <sup>7</sup>	F 1		テーマコード (参考)
C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/02	C	4BO24
C 1 2 N 1/20	C 1 2 N 1/20	Z	4BO64
C 1 2 P 21/00	C 1 2 P 21/00	C	4BO65
// C12N 15/09	C 1 2 N 15/00	ZNAA	

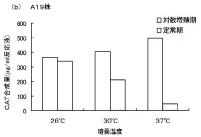
審査請求 未請求 請求項の数 14 OL (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2004-105251 (P2004-105251)	(71) 出願人	503359821
(22) 出願日	平成16年3月31日 (2004.3.31)		独立行政法人理化学研究所
(31) 優先権主張番号	特願2003-145221 (P2003-145221)		埼玉県和光市広沢2番1号
(32) 優先日	平成15年5月22日 (2003.5.22)	(74) 代理人	100080816
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 加藤 朝道
		(74) 代理人	100116528
(出願人による申告)	国等の委託研究の成果に係る特許		弁理士 三宅 俊男
出願(平成15年度、	文部科学省、タンパク3000プ	(72) 発明者	松田 夏子
ロジェクト委託研究、	産業活力再生特別措置法第30条		神奈川県横浜市鶴見区末広町1丁目7番2
の適用を受けるもの)			2号 独立行政法人理化学研究所 横浜研
			究所内
		(72) 発明者	木川 隆則
			神奈川県横浜市鶴見区末広町1丁目7番2
			2号 独立行政法人理化学研究所 横浜研
			究所内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】無細胞タンパク質合成用抽出液の製造方法及びその方法により製造される細胞抽出液







								П						П	П					П	П																	
				П																	_																	
		_																_			П	П	П	П		П	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П		10
	_																													_	_							
			Ц	Ц	Ц	Ц	П	Ц	П	Ц	Ц	Ц	۳	. []	П	П	П	٠ر	. []	П	П	П	Ц	Ц		П					Ц		Ц		П	Ц	П	
																																						20
																°C																						
													°C					°C																				
				П	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П		П	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П	
_														П	ш				Ш			ш						Ш										
																																						30
																																		_	_	_	_	<i>3</i> 0
						_	_		_																													
									П	П				П		П	П	П		П	П		П			П	П											40
								_						_	_		_	_			_		_								_		_			_	_	
							Ш																															
																							_		_													
					_							_		_	_	_	_		_		_		_	_		_	_	_	_	_								50

```
10
20
30
40
пппппп
50
```

```
10
20
30
40
50
```

0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	a
ch, (1984), pp. 231-270, Henes, B.D. et al. eds., IRL Press, Oxford) [	I
	10       
	•
	40

```
exponential phase)
10
cription and Translation - A Practical Approach, (1984), pp. 179-209, Henes, B.D.
. et al. eds., IRL Press, Oxford) \cite{Mathematical Press}
20
Paterson, B. M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 2330-2334, 1973) [ [ ] [ ] [ ] [
30
40
пппппп
50
```

```
10
_ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ (ribosomal RNA
20
30
40
Benzinger et al., J. Virol., 15, 861-871, (1975); Lorenz and Wackernagel, Micro
bi ol Rev., 58, 563-602, (1994))
50
```

																											_							
_		_								pl																							10	0
			Sr 	oir               	ir           	n,             	A	□ □ aly	 al.      er[	,         	Me	et h	ds	i r	n E	Enz	yr     	1001	.,	□ □	217 	7,	12 	23-               	14 0 de	2,        al	]     yz	L99           er	93[     	_				
	ce[ ] [] ] [] ] []									Pc																	     	     					20	Э
																																	30	O
																																	40	O .
																																	5/	0

□ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □		10
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0		20
HEPES-KOH pH7.5 ジチオスレイトール ATP	58.0 mM 2,3 mM 1.2 mM	
CTP, GTP, UTP クレアチンリン酸 クレアチンキナーゼ ポリエチレングリコール 8000 3',5'-cAMP L(-)-5-フォルミル-5,6,7,8,-テトラ-ヒドロ葉酸 大腸菌トータルtRNA グルタミン酸カリウム 酢酸アンモニウム 酢酸マグネシウム アミノ酸(20種類) T7RNA ポリメラーゼ	各 0.9 mM 81.0 mM 250.0 µg/ml 4.00% 0.64 mM 35.0 µg/ml 170.0 µg/ml 200.0 mM 27.7 mM 10.7 mM 各 1.0 mM	30

大腸菌株	生育相	粗リボソーム量	CAT合成量	CAT合成量
		(A260/ml抽出液)	(µg/ml反応液)	(µg/単位リボソーム)
BL21株	対数増殖期	224	650	12.1
	定常期	89	50	2.3
A19株	対数増殖期	231	497	8.6
	定常期	65	46	2.9

大腸菌株	生育相	粗リボソーム量	CAT合成量	CAT合成量
		(A260/ml抽出液)	(µg/ml反応液)	(μg/単位リボソーム)
BL21株	対数増殖期	209	675	13.4
	定常期	131	516	16.4
A19株	対数増殖期	202	405	8.4
	定常期	149	213	6. 0

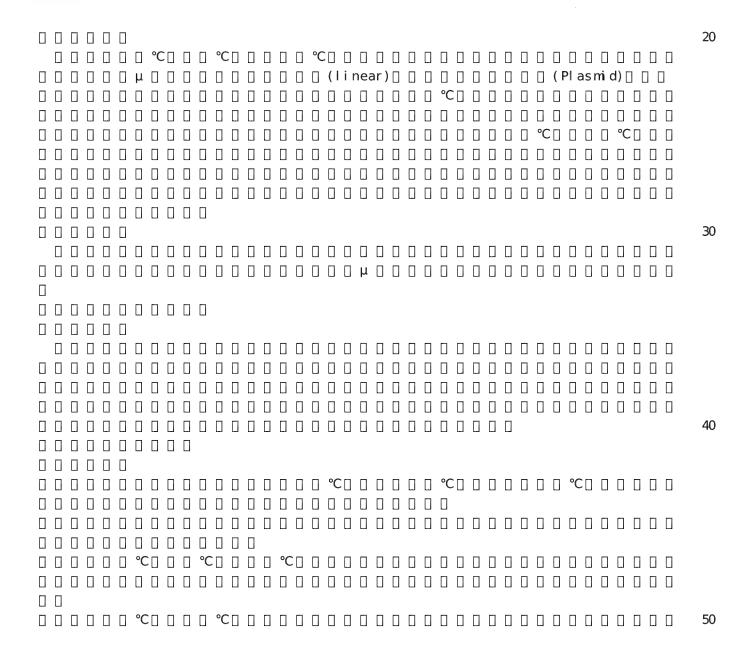
大腸菌株	生育相	粗リボソーム量	CAT合成量	CAT合成量
		(A260/ml抽出液)	(μg/ml 反応液)	(μg/単位リボソーム)
BL21株	対数増殖期	209	566	11. 3
	定常期	133	568	17.8
A19株	対数増殖期	203	364	7.5
	定常期	158	340	9.0

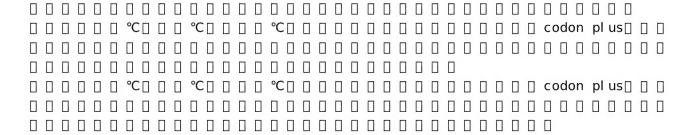
培養温度	生育相	湿菌体量	S30抽出液量
		(g/7 培養液)	(ml/7l培養液)
37℃	対数増殖期	45.5	38
	定常期	80.5	56
26°C	対数増殖期	45.5	38
	定常期	94.5	66

																		(全	量	50	щ	ス	ケ	<b>—</b> )	レ)													
	で50,					- 1				_														,,,	اندر													
	om IV pand				VΔ	ሐ	TJ >	ィー		ΗŤ												0	1 1		μ I μ I													
	- プラ 5mN				U J	uΝ	/1 /																		μ Ι													
	−プラ ⊸=																								μΙ													
	×Hi																								μI													
	型DN.																						Ĺ	50	pg													
			_																																			-
			_	_	П	⊔		Ц	Ц	Ц	Ц	Ц	Ц	П	П	ш	П	Ц	П	Ш																		40
																					П	Ц	Ц	Ц	Ц	⊔	Ц	П	⊔	Ц	Ц	Ц	Ц	Ц	Ц	Ц	Ц	
															_				_										_		_		_	_	_	_	_	
												_		_				_	_	_	°C											ш.			_		_	
		_									_	_	_	_	_	_	_		_	_	_		_											_				
′ 🛮				M1	.3	Re	ev[	] 5	5' -	AΔ														3' [				] [	] [	] [		] [		] [	] [	] [		
					_	_	_																				3' [	] [	] [	] [		] [	] [	] [	] [	] [	]	
																															- [	] [	] [	] [	] [	] [		
		_													_	_		_		_	_	_							_	_	_	J	J	J	_	J	J	-
		_																_		_		_			_						П	П	П	П	П	П		30
		_	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П		П	П								
			П																																			
		_																																				
		_							_			_	_			_			_	_	_																	
																				°C																		
			П																																			
		П	Ц	Ш	Ц	П	Ш	Ш	П	Ц	Ц	Ц	Ш	Ш	П	П	П	Ц	П	Ш	П	П	Ш	Ц	Ц	Ш	Ц	Ш	П	L	Ш	Ш	Ш	Ш	П	Ц	Ц	20
												_			_	_	_		_																_			20
		_									_	_	_		_	_	_	_	_	_	_	_													_		_	
																																					_	
		_										_					_	_	_	_	_	_																
		_	_		_	_	_	_							°C																							
	ПП	_	_	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П																									
	ПП	П	_	Ц	Ц	Ц		Ц	Ц	Ц	Ц																											
									_									°C																				
																																						10
		_	_																																			
ПП	ПП	П	П																																			

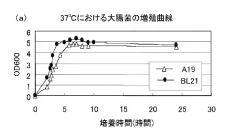
Zubay et al.	
, Annu. Rev. Geneti., 7, 267-287, 1973 [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [	
	10
μοοοοοοοοοοοοο	
組成機能	
HEPES-KOH pH7. 5 58. 0 mM	
ジチオスレイトール (DTT) 1.8 mM	
ATP 1.2 mM	
CTP, GTP, UTP 各 0.8 mM	
クレアチンリン酸 80.0 mM	20
クレアチンキナーゼ 0.25 mg/ml	
ポリエチレングリコール 8000 4.0 %	
3', 5' -cAMP 0.64 mM	
L(-)-5-フォルミル-5, 6, 7, 8, -テトラ-ヒドロ葉酸 68 μM	
大腸菌トータル t RNA 175 μg/ml	
グルタミン酸カリウム 210.0 mM	
酢酸アンモニウム 27.5 mM	
酢酸マグネシウム 10.7 mM	
アミノ酸(20種類) 各 1.5 mM	
アジ化ナトリウム 0.05 %	30
T7RNA ポリメラーゼ 66.6 μg/ml	
大腸菌 \$30 抽出液 反応液の 30 容量%	
<b>鋳型DNA</b> 0.5-4 μg/ml	

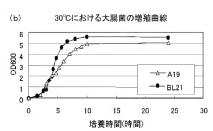
組成	濃度
HEPES-KOH pH7. 5	58.0 mM
ジチオスレイトール(DTT)	1.8 mM
ATP	1.2 mM
CTP, GTP, UTP	各 0.8 mM
クレアチンリン酸	80.0 mM
クレアチンキナーゼ	$0.25~\mathrm{mg/ml}$
ポリエチレングリコール 8000	4.0 %
3', 5' -cAMP	O. 64 mM
L(-)-5-フォルミル-5, 6, 7, 8, -テトラ-ヒドロ葉酸	68 μM
グルタミン酸カリウム	210.0 mM
酢酸アンモニウム	27.5 mM
酢酸マグネシウム	14.9 mM
アミノ酸(20種類)	各 1.5 mM
アジ化ナトリウム	0.05 %
Tris-acetate (pH8.2)	3 mM
酢酸カリウム	18 mM

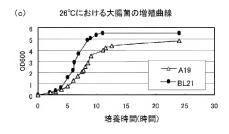


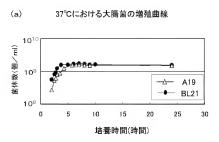


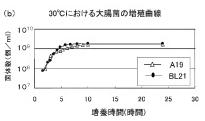


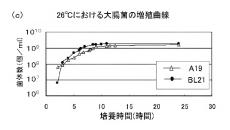




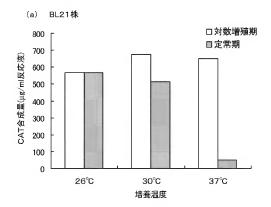


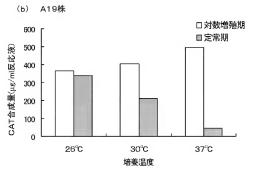


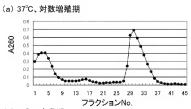


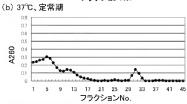


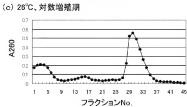


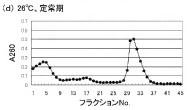




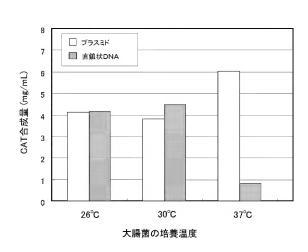


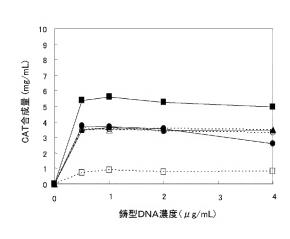






## 







□ □ □ □ □ **□ 2005006646000001.** app

(72) (72) 🛮 🖺 🔻 (72) 🛮 🗎 🖂 (72) 🛮 🗎 🖂 (72) \_ \_ \_ \_ (\_ \_ ) 4B024 AA20 BA80 CA01 CA12 GA19 HA01 4B064 AC25 AG01 CA02 CA50 CC06 CC24 CE02 CE06 DA20 4B065 AA26X AC14 BC03 CA24 CA60